

PRODUCTION OF CHONDROITIN SULFURIC ACID DECOMPOSITION PRODUCT BY IMMOBILIZED MOLD

Publication number: JP62130696

Publication date: 1987-06-12

Inventor: KIMURA HIKARI; MURATA KOSAKU; NONAKA MICHIO; SATO NOBUYUKI

Applicant: TAIYO FISHERY CO LTD

Classification:

- international: **C12N11/04; C12P19/04; C12P19/26; C12R1/01; C12R1/20; C12R1/37; C12R1/38; C12R1/44; C12R1/445; C12N11/00; C12P19/00; (IPC1-7): C12N11/04; C12P19/04; C12P19/26; C12R1/01; C12R1/20; C12R1/37; C12R1/38; C12R1/44**

- european:

Application number: JP19850270745 19851203

Priority number(s): JP19850270745 19851203

Report a data error here

Abstract of JP62130696

PURPOSE:To eliminate a purifying process of enzyme, to recover an immobilized mold and to reuse it, by bringing the immobilized mold of a bacterium containing an enzyme capable of decomposing chondroitin sulfuric acid into contact with chondroitin sulfuric acid and separating a formed chondroitin sulfuric acid decomposition product. **CONSTITUTION:**A mold obtained by growing a bacterium such as *Proteus vulgaris*, etc., containing an enzyme capable of decomposing chondroitin sulfuric acid in a nutritive medium or a mold obtained by further treating the mold in a derived medium is immobilized, hardened and molds between lattices are destroyed by a physical and chemical means. The immobilized mold is brought into contact with chondroitin sulfuric acid and a chondroitin sulfuric acid decomposition product is obtained. A solution having finished the reaction or a column effluent is passed through a molecular sieve and unreacted chondroitin sulfuric acid, etc., are readily separated.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

5

(3)

(3)

体を得る。

培養地で生育させた菌体、または更に誘導培
地で処理した菌体を、適当な緩衝液例えばトリ
ス塩緩衝液に懸濁させ、適当な物理化学的処理例
えば音波処理またはトルエン処理によって菌体を
破壊し、この物理化学的処理菌体をコンドロイチ
ン硫酸と接触させても、コンドロイチン硫酸分解
生成物を得ることができる。この方法は、従来の
精製酵素を使用する方法よりは煩雑でなく、目的
とする分解生成物の収量も高いが、回分法でしか
利用できず、前記処理菌体の回収再利用も実質的
に不可能である。

本発明では、前記の菌体を固定化する。

本発明においては、固定化用の担体として、ポ
リアクリルアミドゲル、光硬化樹脂、アルギン酸
カルシューム、カラギーナンまたは寒天を使用す
る。好ましい担体はカラギーナンである。

本発明においては、前記の担体を使用し、それ
自体公知の方法で菌体を固定化する。例えばカラ
ギーナンを担体として使用する場合には以下の方
法で固定化する。培養地で生育させた菌体、ま
たは好ましくは誘導培地で処理した菌体を、1～
1.2 g/ml (湿重量) の濃度で0.8～0.9%生理食塩
水に懸濁し、40～50℃に加熱する。一方、0.8～
0.9%生理食塩水にカラギーナンを溶かして0.8～
0.9%溶液を調整し、40～50℃に加熱してから前
記の菌体懸濁液と約1:1の容量比で手早く加
えて均一な懸濁液とする。この混合懸濁液を前記
の温度に維持しながら注射器で吸い取り、20～25
℃の2%KCl/0.35M KPB(pH7.0) 溶液中に滴
下すると、直径2～3 mmのビーズ形状固定化
菌体を得ることができる。あるいは、前記の混合
懸濁液を適当な容器に入れ、氷水浴で冷却して、
2%KCl/0.35M KPB(pH7.0) 溶液中でゲル化
させることにより、例えば1辺1～2 mmの立方体
形のゲル状固定化菌体を得ることができる。

次にゲル格子からコンドロイチン硫酸分解酵
素が抽出されるのを防止するために、前記のゲル状固
定化菌体を硬化処理する。8 mMヘキサメチレン
ジアミンおよび2%KClを含むリン酸緩衝液
(pH約7) に、前記のゲル状固定化菌体を0.1～
0.5 g/mlの濃度で懸濁し、静かに攪拌しながら
0～30℃で5～20分間処理する。続いて、アルデ
ヒド化合物例えばジアルデヒドスチロールおよび25

～30%グルタルアルデヒド水溶液を少量 (前記懸
濁液に対して1/25～1/30容) 加えて更に0.5～2
時間攪拌を続ける。こうして硬化固定化菌体を得
ることができる。

前記の硬化固定化菌体の格子内に包括されてい
る菌体の崩壊されていないので、コンドロイチン
硫酸との接触が必ずしも充分ではない。そこで格
子内の菌体を物理化学的手段で破壊し、固定化菌
体の分解活性を高めることが好ましい。菌体の破
壊は、例えば、トルエン1～20容量%好ましくは
8～10容量%とコンドロイチン硫酸0.1～1%好
ましくは約0.5%とを含有するリン酸緩衝液に、
前記の固定化菌体を0.1～0.5 g/mlの濃度で懸濁
し、約0℃において0.5～3時間好ましくは30分
間、劇しく攪拌することによって実施する。あるい
は、トルエン処理を行うことなく、自己溶菌を利
用して温和に溶菌させる方法もある。

こうして得られた固定化菌体は、コンドロイチ
ン硫酸0.3～0.5%を含むトリス塩緩衝液で充分
に洗浄してから、再び同じ緩衝液に浸漬し、約4
℃で保存する。こうして、コンドロイチン硫酸分
解活性の非常に高い固定化菌体を得られる。

本発明方法において、前記の固定化菌体と接触
させるコンドロイチン硫酸は、精製されたもので
ある必要はなく、部分精製物でもよい。

本発明による固定化菌体とコンドロイチン硫酸
との接触は、回分法または連続法のいずれでも行
うことができる。回分法においては、例えば、リ
ン酸緩衝液 (pH6～9、好ましくは約8) 中
に、固定化菌体5 g (固定化処理前の湿菌体換
算) に対して0.1～3%コンドロイチン硫酸/
0.1M KPB 5 mlの割合で両者を懸濁させ、20～
40℃好ましくは30～35℃で過渡する。その際、マ
グネシウムイオン存在下で両者を接触させると酵
素活性が向上し、一発には例えば塩化マグネシウ
ム450 mMを存在させることが好ましい。あるいは
、固定化菌体をカララムに充填し、コンドロイチ
ン硫酸0.1～3%好ましくは0.5～1%を含むリン
酸緩衝液 (pH6～9、好ましくは約8) を20～
40℃好ましくは約35℃で、空間速度 (S.V.) 0.1
～2 (時間)⁻¹ 好ましくは空間速度約0.5 (時間)⁻¹
で連続的に通過流下させることにより、コンドロ
イチン硫酸分解生成物を得ることができる。

本発明方法によって得られるコンドロイチン硫

7

(4)

(4)

酸分解生成物は、各種の硫酸化オリゴ糖、硫酸化
二糖、およびそれらの混合物である。

コンドロイチン硫酸分解生成物は、反応終了液
またはカララム流出液を分子ふるい例えばセファデ
ックスG-50に通過することによって未反応のコ
ンドロイチン硫酸等と容易に分離することができ
る。回分法で使用する固定化菌体は分離後再回収
して再使用することができる。

【実施例】

以下、実施例によって本発明を更に詳細に説明
するが、本発明はこれらの実施例によって限定さ
れるものではない。

例 1

プロテウス・ブルガリスNCTC4638を栄養培
地 (グルコース0.1%、食塩0.5%、酵母エキス0.5
%およびベプトン1%含有; pH7.2) 1000 ml中で
30℃において20時間振盪培養した。菌体を遠心分
離によって集め、0.85%生理食塩水で洗浄し、
得られた菌体5 gを誘導培地 (第二リン酸カリ
ウム0.7%、第一リン酸カリウム0.3%、硫酸アン
モニウム0.1%、硫酸マグネシウム0.01%、ペプ
トン0.1%、ニコチン酸0.1%およびコンドロイチ
ン硫酸0.3%含有) 1000 ml中に移し、30℃で12時
間振盪培養した。遠心分離によって集めた菌体
の一部分 (1 g) を10 mMトリス塩緩衝液 (pH
7.0) 2 ml中に懸濁し、90 KHzで0℃で5分間音
波処理して菌体破砕物を得た。また、前記の誘導
液処理した菌体破砕物の他の一部分 (0.5 g) を10 mM
トリス塩緩衝液 (pH7.0) 0.5 mlに懸濁し、これ
にトルエン0.1 mlを加え、30℃で10分間劇しく攪
拌してトルエン処理菌体を得た。前記の音波処理
菌体、トルエン処理菌体および無処理のプロテウ
ス・ブルガリスNCTC4638菌体 (対照用) を、
酸カルシウム緩衝液1 ml中で37℃において1時間
反応させた。得られた二糖の量を以下の表1に示
す。

次に、塩化カリウム2%およびヘキサメチレン
ジアミン80 mMを含む0.35 Mリン酸カルシウム緩
衝液 (pH7.0) 600 mlに、前記のゲル状固定化菌体
20 gを懸濁し、静かに攪拌しながら25℃で10分間
処理した。続いて25%グルタルアルデヒド水溶液
25 mlを加えて更に1時間攪拌を続けて硬化させ
た。トルエン9容量%とコンドロイチン0.5%と
を含有する0.35 Mリン酸カルシウム緩衝液600 ml
に前記の硬化固定化菌体20 gを懸濁し、0℃で20
分間劇しく攪拌した。

こうして得られた固定化菌体0.5 gを、コンド
ロイチン硫酸3%含有の0.1 Mリン酸カリウム緩
衝液2.5 mlに懸濁し、37℃で反応させた。結果を
以下の表2に示す。

表 1

菌体処理物	二糖生成物(mg/ml)
生菌体	7.3
音波処理菌体	29.6
トルエン処理菌体	25.4

例 2

プロテウス・ブルガリスNCTC4638を例1と
同じ栄養培地で例1と同じ条件下で生育させ、得
られた菌体5 gを更に例1と同じ誘導培地に移
し、30℃で12時間振盪した。遠心分離して集めた
菌体5 gを0.85%生理食塩水10 mlに懸濁し、40
℃に加熱した。一方、0.85%生理食塩水中のキ
カラギーナン3.1%溶液10 mlを調整して40℃に加
温してから前記の菌体懸濁液中に手早く加えて均
一な懸濁液とした。この混合懸濁液を40℃に維持
したまま注射器で吸い取り、22℃の2%塩化カリ
ウム水溶液中に滴下し、直径2～3 mmのビーズ形
ゲル状固定化菌体を得た。

次に、塩化カリウム2%およびヘキサメチレン
ジアミン80 mMを含む0.35 Mリン酸カルシウム緩
衝液 (pH7.0) 600 mlに、前記のゲル状固定化菌体
20 gを懸濁し、静かに攪拌しながら25℃で10分間
処理した。続いて25%グルタルアルデヒド水溶液
25 mlを加えて更に1時間攪拌を続けて硬化させ
た。トルエン9容量%とコンドロイチン0.5%と
を含有する0.35 Mリン酸カルシウム緩衝液600 ml
に前記の硬化固定化菌体20 gを懸濁し、0℃で20
分間劇しく攪拌した。

こうして得られた固定化菌体0.5 gを、コンド
ロイチン硫酸3%含有の0.1 Mリン酸カリウム緩
衝液2.5 mlに懸濁し、37℃で反応させた。結果を
以下の表2に示す。

表 2

反応時間	二糖生成物(mg/ml)
0時間	0
1時間	16.4
2時間	22.5
3時間	29.6
6時間	30.2

例 3

前記例 2 で得た固定化菌体 0.5 g を、コンドロイチン硫酸 5% と種々の濃度の塩化マグネシウムとを含む 0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 2.5 ml 中に懸濁し、37℃ で 10 分間反応させたところ、以下の表 3 に示すところの結果が得られた。

表 3

塩化マグネシウムの濃度 (mM)	二糖生成量 (mg/ml)
0	20.4
10	26.5
30	31.3
50	43.3
100	36.4

例 5

前記例 2 で得た固定化菌体 10 ml をカラムに充填し、コンドロイチン硫酸 1% と塩化マグネシウム 50 mM とを含む 0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を 35℃ で種々の空間速度で連続的に導通した。結果を以下の表 5 に示す。

表 5

空間速度 (時間 ⁻¹)	二糖生成量 (mg/ml)
0.1	14.8
0.3	13.6
1	10.2
2	4.3

例 4

プロテウス・ブルガリス NCTC 6356 の代わり以下に以下の表 4 に記載の細菌を使用すること以外は、前記例 3 に記載の方法によつて固定化菌体を調製し、その固定化菌体を例 2 と同じ条件でコンドロイチン硫酸と 1 時間反応させた。結果を以下の表 4 に示す。

表 4

固定化した菌体	二糖生成量 (mg/ml)
プロテウス・ミラビリス (Proteus mirabilis) IFO 3849	9.6
バクテロイデス・セタイタミクロン (Bacteroides thetaiotaomicron) NCTC 10852	8.2
スタフィロコッカス・オーレウス (Staphylococcus aureus) IFO 3183	6.8

〔発明の効果〕

本発明による固定化菌体は、前記のとおり、高いコンドロイチン硫酸分解酵素活性を示す。これは、基質であるコンドロイチン硫酸が分子量の大きな高分子物質であるにもかかわらず、本発明の固定化菌体の格子を通過することによるものであり、予想外のことである。

本発明によれば、煩雑な酵素精製工程が不要となり、固定化菌体は安定で取扱い上便利であり、回収して再使用が可能であり、更に、連続法に使用できる等の利点をもつ。